



## Scientia Agropecuaria

Facultad de Ciencias  
Agropecuarias

Universidad Nacional de Trujillo

### Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque

### Polyhydroxyalkanoates of strains of *Azospirillum* spp. isolated of roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomato” and *Oryza sativa* L. “rice” in Lambayeque

Katty Baca<sup>1</sup>, Melgy Sánchez<sup>1</sup>, Carmen Carreño<sup>1,\*</sup>, Gilmar Mendoza<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Av. Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú.

<sup>2</sup> Fac. de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

Recibido 12 noviembre 2010; aceptado 21 diciembre 2010

#### Resumen

En este trabajo se determinó la concentración de polihidroxicanoatos (PHAs) de cepas de *Azospirillum* aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz”, como una alternativa ante la acumulación de plásticos derivados del petróleo. Raíces previamente desinfectadas se sembraron en medio Nfb semisólido, donde las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador al azul. El género *Azospirillum* se identificó en medio rojo de Congo, obteniéndose 96 cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense* en tomate y arroz. Se realizó una fermentación discontinua con caldo *Azotobacter* modificado, alimentando con una solución saturada de ácido málico cada 12 horas y se realizaron tinciones con Sudán Negro B. Se seleccionaron las cepas con mayor número de gránulos de PHAs (en tomate, 18 de *A. lipoferum* y 2 de *A. brasilense* y en arroz, 10 de *A. lipoferum* y 10 de *A. brasilense*) y se cuantificó la biomasa y PHAs. La concentración de PHAs alcanzó 0.661 gL<sup>-1</sup> en *A. lipoferum* KM(T)-73 y 0.738 gL<sup>-1</sup> en *A. brasilense* KM(T)-19. Las cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense* aisladas de tomate alcanzaron una mayor concentración de biomasa y PHAs frente a las cepas aisladas de arroz.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, PHAs, *Lycopersicon esculentum* Mill, *Oryza sativa* L.

#### Abstract

In this work was determined the concentration of polyhydroxyalkanoates (PHAs) of *Azospirillum* strains isolated from roots of *Lycopersicon esculentum* Mill "tomato" and *Oryza sativa* L. "rice" as an alternative to accumulation of petroleum-based plastics. Previously disinfected root were plated in Nfb semisolid medium where nitrogen-fixing bacteria were recognized by a whitish film on the surface and turn from green to blue. The genus *Azospirillum* was identified in Congo red agar medium, obtained 96 isolates of *A. lipoferum* and *A. brasilense* on tomato and rice. Batch fermentation was performed with broth *Azotobacter* modified feeding a saturated solution of malic acid every 12 hours and were stained with Sudan Black B. Strains were selected with the greatest number of PHAs granules (in tomato, 18 of *A. lipoferum* and 2 of *A. brasilense*; in rice, 10 of *A. lipoferum* and 10 of *A. brasilense*) and quantified the biomass and PHAs. PHAs concentration reached 0.661 gL<sup>-1</sup> in *A. lipoferum* KM(T)-73 and 0.738 gL<sup>-1</sup> in *A. brasilense* KM(T)-19, both isolated from tomato. Strains of *A. lipoferum* and *A. brasilense* isolated from tomato reached a higher concentration of biomass and PHAs against the strains of rice.

**Keywords:** *Azospirillum*, PHAs, *Lycopersicon esculentum* Mill, *Oryza sativa* L.

\* Autor para correspondencia

E-mail: ccarreño@hotmail.com (C. Carreño)

## 1. Introducción

Los plásticos son la base de la mayoría de los productos de consumo habituales, pero una vez que dejan ser usados, se convierten en residuos permanentes difíciles de eliminar del ambiente y al no ser biodegradables, se acumulan en los vertederos, constituyendo así una forma común de contaminación ambiental. Además, los plásticos tradicionales se producen a partir del petróleo, una fuente de energía contaminante, causante de emisiones de gases con efecto invernadero y no renovable cuyas reservas en pocos años se habrán agotado (Matías, 2009). Una alternativa ante esta problemática son los polihidroxialcanoatos (PHAs), o polímeros lineales de R-3-hidroxiácidos en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Martínez *et al.*, 2004). Estos poliésteres presentan las mismas propiedades que los plásticos derivados del petróleo, pero son biodegradables, biocompatibles, producidos y acumulados en gránulos intracelulares por numerosas especies de bacterias, en condiciones limitantes de nutrientes esenciales para el crecimiento (nitrógeno, azufre o fosfatos) y exceso de carbono. Cuando éste se agota, o si el nutriente limitante es suministrado nuevamente, los PHAs son depolimerizados y posteriormente metabolizados como fuente de carbono y energía (De Almeida *et al.*, 2004). El representante más común de los PHAs es el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y es producido por bacterias del género *Azospirillum* (Cholula, 2005).

*Azospirillum* spp. tiene rutas metabólicas de utilización del carbono y nitrógeno muy versátiles, adaptadas para establecerse en ambientes competitivos donde predominan la desecación y limitación de nutrientes. Además, estas bacterias tienen mecanismos fisiológicos eficientes como la formación de quistes y flóculos, producción de melanina y protección interna contra esporas de hongos

que les ayudan a sobrevivir en condiciones desfavorables (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). El cambio morfológico está acompañado por el desarrollo de una capa externa de polisacáridos y por la acumulación de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, que pueden servir como fuente de carbono y energía bajo condiciones de estrés e inanición y que no sólo tienen propiedades similares a las del petróleo sino que, además, son biodegradables en un tiempo promedio de 6 a 12 meses cuando se exponen a la microbiota del suelo y a los sedimentos marinos.

En los suelos agrícolas donde se encuentran las bacterias productoras de PHAs, existen marcadas diferencias entre las condiciones y manejo de los cultivos como *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz”, importantes en la región Lambayeque. Es posible que dichas condiciones definan las diferentes concentraciones de PHAs que producen las bacterias del género *Azospirillum*; sin embargo, en la región Lambayeque no se han realizado estudios para obtener esta información, que permitirá el aislamiento de cepas de *Azospirillum* spp. con una alta concentración de PHAs y que potencialmente podrían ser utilizadas para la producción de plásticos biodegradables. Por lo expuesto, se realizó el presente estudio, cuyos objetivos fueron aislar e identificar cepas de *Azospirillum* spp. de raíces de tomate y arroz cultivados en los distritos de Reque y Pomalca respectivamente en Lambayeque, así como detectar y cuantificar gránulos de PHAs y determinar la concentración de PHAs en estas cepas nativas.

## 2. Materiales y métodos

### Diseño metodológico

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases. En la primera se realizó el aislamiento, identificación del género y especies de *Azospirillum* spp. obtenidas de raíces de

tomate y arroz. En la segunda fase se detectaron y cuantificaron gránulos de PHAs y se determinó la concentración ( $\text{gL}^{-1}$ ) de PHAs en las cepas nativas de *Azospirillum* spp. En ambas fases se utilizó un diseño no experimental transeccional descriptivo (Hernández *et al.*, 2003).

### Muestreo

Durante los meses de febrero a mayo de 2010 se recolectaron 192 muestras de raíces de cultivos de tomate y arroz, en fructificación, establecidos en campos comerciales de los distritos de Reque ( $6^{\circ} 48'$  y  $6^{\circ} 52'$  de latitud sur y  $79^{\circ} 44'$  y  $79^{\circ} 50'$  de longitud oeste) y Pomalca ( $6^{\circ} 45'$  y  $6^{\circ} 46'$  de latitud sur y  $79^{\circ} 46'$  y  $79^{\circ} 48'$  de longitud oeste) provincia de Chiclayo, región Lambayeque. La zona presenta un clima subtropical árido y el suelo es ligeramente alcalino (pH: 7.30) y salino (CE:  $9.82 \text{ mmhos cm}^{-1}$ ), en los campos cultivados con tomate así como fuertemente alcalino (pH: 8.05) y fuertemente salino (CE:  $12.75 \text{ mmhos cm}^{-1}$ ) en los campos de arroz, con una textura franco areno-arcilloso, un contenido bajo de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y carbonatos, así como un contenido muy alto de potasio en ambos cultivos. Las muestras se depositaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.

### Obtención de cepas nativas de *Azospirillum* spp.

Las raíces se lavaron con agua potable hasta eliminar el suelo remanente. A continuación, se cortaron en secciones de aproximadamente 2 cm, se desinfectaron con hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 2 % durante 5 minutos y se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril. Para favorecer el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se realizó el enriquecimiento de cada una de las muestras, depositando las raíces de 10 a 15

mm por debajo de la superficie en tubos conteniendo 6 mL de medio libre de nitrógeno con azul de bromotimol (Nfb) semisólido (un fragmento por tubo). La incubación se realizó en aerobiosis a  $30^{\circ}\text{C}$  por 5 días y se seleccionaron los tubos donde se observó viraje del color verde hacia el azul y la presencia de una película gruesa blanquecina entre 3 a 5 mm bajo la superficie. Posteriormente, se tomó una alícuota de la película, con la que se obtuvo una suspensión en 1 mL de solución salina fisiológica estéril y se sembró por agotamiento y estría en placas de Petri con medio Nfb sólido con  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de extracto de levadura. Después de una incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 3 a 5 días, se desarrollaron colonias blanquecinas y pequeñas con viraje del verde al azul. A continuación, se realizó tinción de Gram y cuando se observaron bacilos Gram negativos, se seleccionó la colonia y se sembró en medio Nfb semisólido en aerobiosis a  $30^{\circ}\text{C}$  por 1 semana y posteriormente en placas de Petri con agar rojo de Congo a  $30^{\circ}\text{C}$  por 48 a 72 horas. Después se seleccionaron las colonias rojo escarlata, se realizó tinción de Gram y se sembró en placas de Petri con agar nutritivo para obtener cultivos puros. La identificación de *Azospirillum* spp. se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas (Holt *et al.*, 1994).

### Detección y cuantificación de gránulos de PHAs

Para la obtención del inóculo, cada una de las cepas nativas de *Azospirillum* spp. se cultivaron en 1.7 mL de caldo *Azotobacter* modificado y se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm durante 20 horas. Para el proceso fermentativo en lote alimentado discontinuo, los cultivos fueron llevados a frascos con 15 mL de caldo *Azotobacter* modificado e incubados a  $30^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm durante 24 horas. Después se inició la adición de 0.08 gramos de carbono cada 12 horas mediante la incorporación de 3 mL de una solución concentrada de ácido málico estéril. El

régimen de alimentación discontinua se mantuvo hasta las 48 horas. Cada 12 horas a partir de las 36 horas de realizada la inoculación, se tomó una alícuota de cada uno de los cultivos para detectar la producción de PHAs, se realizaron las extensiones y se colorearon con Sudán Negro B. La presencia de gránulos negros o grisáceos en el interior de las células vegetativas rosadas se consideró como positivo para la detección de PHAs. En simultáneo se contó el número de gránulos de PHA en tres campos microscópicos a razón de cinco células por campo. El conteo se realizó 12 horas después de la primera y segunda alimentación con ácido málico, resultando como máximo siete gránulos contados por célula bacteriana y considerando un valor de ocho para las células que presentaban el soma totalmente coloreado. Debido a que mostraron el mayor número de gránulos de PHA fueron seleccionadas 20 cepas de *Azospirillum* spp. de tomate y 20 de arroz para determinar la concentración de PHAs.

### **Determinación de la concentración de PHAs**

Cada una de las cepas nativas de *Azospirillum* spp. productoras de PHAs se cultivaron por triplicado en 1.7 mL de caldo *Azotobacter* modificado a 30 °C, 150 rpm por 20 horas. A continuación los cultivos fueron inoculados en frascos con 15 mL de caldo *Azotobacter* modificado y se incubaron a 30 °C, en agitación constante (150 rpm) hasta por 72 horas con alimentación de carbono cada 12 horas a partir de las 24 horas, momento en el que se tomaron 6 mL de muestra para determinar la absorbancia a 600 nm y después cuantificar la biomasa y PHAs producidos por las cepas nativas de *Azospirillum* spp. Para cuantificar la biomasa, 5 mL de cada uno de los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm durante 30 minutos, el sedimento o paquete celular se lavó con agua destilada estéril, después se deshidrató en estufa a 40 °C por 24 horas y se pesó en

una balanza digital. Para cuantificar el PHA, en el tubo que contenía la biomasa deshidratada se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 5% para debilitar la membrana celular y facilitar el proceso de extracción y después de 2 horas se agregó 1 mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero. Transcurridos 20 minutos, los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos y se obtuvieron dos fases, una superior conteniendo hipoclorito de sodio con restos celulares y una inferior correspondiente al cloroformo con el PHA. Inmediatamente después con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero, se depositó en un tubo y se llevó a estufa a 40 °C por 24 horas para acelerar la evaporación del cloroformo. El polímero obtenido fue digerido con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80% durante 30 minutos a 90 °C (baño María), se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se leyó la absorbancia a 235 nm en espectrofotómetro con luz UV (celda de cuarzo). Para verificar la naturaleza del polímero se obtuvieron diluciones de la muestra en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se calentaron por 30 minutos a 90 °C y se realizó un “barrido” en un rango de 220 a 250 nm resultando positivo a la presencia de PHA un pico máximo a 235 nm.

### **Análisis de datos**

Los datos obtenidos en la concentración de biomasa y PHA de las cepas nativas de *Azospirillum* spp. se ordenaron en tablas y figuras que permitieron distinguir la cinética de la producción durante 72 horas. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word 2007 y Microsoft Office Excel 2007.

## **3. Resultados y discusión**

El 77.08% de las muestras de raíces de tomate resultó positivo en el enriquecimiento para bacterias fijadoras de nitrógeno y el 35.42% para el aislamiento de *Azospirillum* spp. En arroz, 70.83% de las muestras resultó positivo en el enriquecimiento y 58.33% para el aislamiento de *Azospirillum* spp. La

positividad de las muestras de raíces de tomate y arroz para el enriquecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno coincide con Hernández (2003); Abril *et al.* (2006) y Schoebitz (2006), quienes informaron que el medio Nfb en el que se adiciona malato como fuente de carbono es óptimo para el desarrollo de fijadores de nitrógeno. Estas bacterias presentan un crecimiento característico que se inicia como un velo delgado varios milímetros o centímetros bajo la superficie, en el punto donde la concentración de oxígeno está en equilibrio con la tasa respiratoria de las células, de manera que no hay un exceso en la cantidad de oxígeno disuelto y se puede observar también un viraje del indicador azul de bromotimol debido a la alcalinización del medio (Hernández, 2003). No todas las bacterias fijadoras de nitrógeno se identificaron como *Azospirillum* spp. coincidiendo con investigaciones previas (Lara *et al.*, 2007; García y Muñoz, 2010) en las que se determinó que en la rizósfera de los cultivos se encuentran bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno de vida libre como especies de *Azospirillum* y además *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Serratia*.

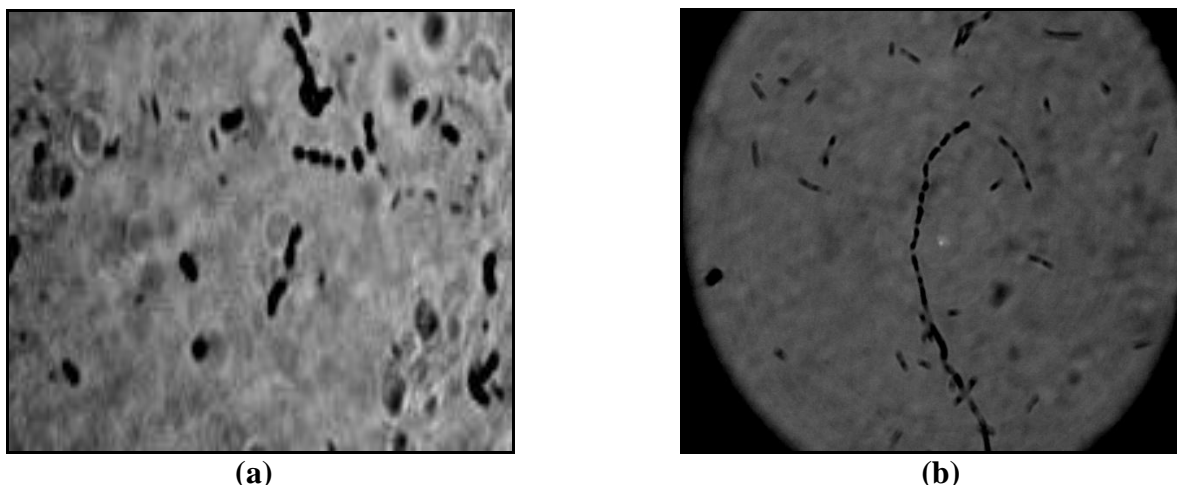
Las raíces de tomate y arroz resultaron adecuadas para el aislamiento de *Azospirillum* spp., coincidiendo con Caballero (2001) quien manifestó que esta bacteria se puede aislar a partir de suelo rizoférico o de la superficie de las raíces (rizoplano) de numerosas plantas hospederas. Por su parte Hernández (2003) y Collados (2006) concluyeron que *Azospirillum* spp. es una bacteria que habita libremente en el suelo; sin embargo, su concentración es mayor en las raíces, en donde se absorbe al mucílago de la superficie principalmente de los pelos radicales. En el 35.42% de raíces de tomate se aisló e identificó *Azospirillum* spp., reportándose por primera vez esta bacteria en la región Lambayeque. En el 58.33% de las raíces de arroz también se aisló *Azospirillum*

spp., coincidiendo con García y Muñoz (2010) quienes reportaron una prevalencia de 55.77% en cultivos del distrito de Pomalca, región Lambayeque.

En tomate, el 89.58% de las cepas fue identificado como *A. lipoferum* y 10.42% como *A. brasilense*. En arroz, el 56.25% fue identificado como *A. brasilense* y 43.75% como *A. lipoferum*. Se han descrito siete especies de *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. doebereineriae* y *A. largimobile* (Cholula, 2005); sin embargo, la mayoría de las cepas aisladas por diversos investigadores pertenecen a las especies *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Bashan *et al.*, 1996). Por esta razón, en el presente estudio se utilizó el agar rojo de Congo en donde mayoritariamente se aíslan *A. lipoferum* y *A. brasilense*, caracterizados por la formación de colonias escarlata de forma circular, opacas, con elevación plana, tamaño de 5 mm, con superficie seca y bordes enteros (Alfonso *et al.*, 2005).

En todas las cepas de *A. lipoferum* y *A. brasilense* aisladas de tomate y arroz se observaron gránulos de PHAs (Figura 1), confirmando la identificación del género según lo manifestado por Hernández (2003) y Alfonso *et al.* (2005). La tinción de Sudán Negro B permite la detección *in vivo* de PHAs, indicando la naturaleza lipídica de los gránulos que se colorean de gris a negro, en contraste con el rosado de las células vegetativas (Hernández, 2003; Carreño *et al.*, 2009).

Los gránulos de PHAs pudieron ser contados desde las 24 horas; observándose desde uno hasta siete por célula bacteriana. Con una cifra mayor las células se tiñeron totalmente de negro, coincidiendo con Hernández (2003), Grados *et al.* (2008) y Razzaq *et al.* (2010), quienes detectaron y cuantificaron gránulos de PHAs teñidos con Sudán Negro B.



**Figura 1.** Gránulos de polihidroxialcanoatos (PHAs) teñidos con Sudan Negro B en bacilos alargados (a) y células pleomórficas (b).

Los PHAs son poliésteres alifáticos que muestran propiedades similares a las de algunos plásticos como el polipropileno pero que son fáciles de biodegradar en 6 a 12 meses (Franco *et al.*, 2009). Son sintetizados y acumulados en el citoplasma por algunos géneros bacterianos, como material de reserva de carbono y energía, cuando el medio de cultivo se encuentra desbalanceado y con exceso de fuente de carbono o con limitaciones físicas, como temperatura no adecuada para el crecimiento (Grados *et al.*, 2008). La presencia de PHAs en las cepas nativas de *Azospirillum* coincide con lo manifestado por investigadores como Lasala *et al.* (2004) y Franco *et al.* (2009), respecto a que las bacterias nitrofixadoras como *Azospirillum* spp., *Mesorhizobium plurifarum*, *Rhizobium tropici* y *Pseudomonas fluorescens* acumulan PHAs como estrategia de supervivencia y de regulación del metabolismo tanto en simbiosis como en vida libre. Las especies de *Azospirillum* sintetizan PHAs en la fase estacionaria de crecimiento en presencia de una fuente de carbono en exceso y el polímero identificado como poli- $\beta$ -hidroxibutirato se observa en grandes cantidades en el citoplasma de las células (Hernández, 2003; Schoebitz, 2006).

El medio de cultivo *Azotobacter* utilizado por Cholula (2005) y modificado aquí al reemplazar el ácido succínico por málico como fuente de carbono resultó adecuado para la producción de PHAs, coincidiendo con Cholula (2005) y Wasim (2006). Ellos concluyeron que *A. brasilense* alcanza el mayor rendimiento de PHAs cuando utiliza ácidos orgánicos como málico, succínico, láctico, pirúvico y algunos aminoácidos. Por su parte, Westby *et al.* (1983) investigaron el metabolismo de 19 fuentes carbonadas en una concentración de  $5 \text{ gL}^{-1}$  obteniendo un crecimiento excelente (++++) con tiempos de generación más cortos con DL malato y DL lactato frente a D-gluconato.

Debido a que presentaron los mayores valores en el número de gránulos de PHAs fueron seleccionadas 20 cepas aisladas de tomate (18 de *A. lipoferum* y 2 *A. brasilense*) y 20 cepas de aisladas de arroz (10 de *A. lipoferum* y 10 de *A. brasilense*), cuyos valores en la concentración de PHAs oscilaron entre  $0.028$  y  $0.661 \text{ gL}^{-1}$  en *A. lipoferum* aisladas de tomate, y entre  $0.002$  y  $0.072 \text{ gL}^{-1}$  en *A. lipoferum* aisladas de arroz (Tabla 1 y 2). En *A. brasilense* aisladas de tomate los valores oscilaron entre  $0.116$  y  $0.738 \text{ gL}^{-1}$  y entre  $0.006$  y  $0.098 \text{ gL}^{-1}$  en cepas aisladas de arroz.

**Tabla 1**

Concentración ( $\text{gL}^{-1}$ ) de polihidroxicanoatos (PHAs) de cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* aisladas de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate”.

Código cepa UNPRG	PHAs ( $\text{gL}^{-1}$ )		
	36 h	48 h	60 h
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-10	0.281	0.380	0.176
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-12a	0.165	0.523	0.209
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-21	0.099	0.287	0.116
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-22b	0.138	0.342	0.242
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-23	0.237	0.309	0.105
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-28	0.055	0.193	0.215
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-39	0.110	0.154	0.121
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-43b	0.119	0.226	0.209
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-50	0.028	0.209	0.220
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-52	0.176	0.397	0.204
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-54	0.182	0.237	0.264
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-64	0.149	0.397	0.253
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-68	0.198	0.320	0.512
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-79	0.347	0.413	0.584
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-88	0.204	0.248	0.165
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-73	0.331	0.661	0.584
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-94a	0.160	0.370	0.132
<i>A. lipoferum</i> KM(T)-96a	0.242	0.430	0.270
<i>A. brasilense</i> KM(T)-19	0.116	0.738	0.490
<i>A. brasilense</i> KM(T)-24	0.165	0.486	0.413

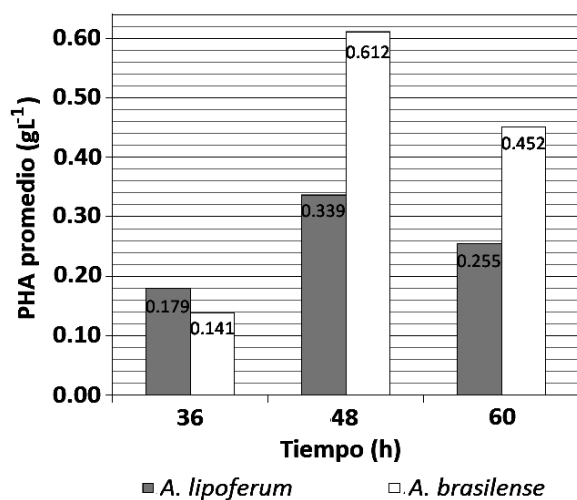
**Tabla 2**

Concentración ( $\text{gL}^{-1}$ ) de polihidroxicanoatos (PHAs) de cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* aisladas de *Oryza sativa* L. “arroz”

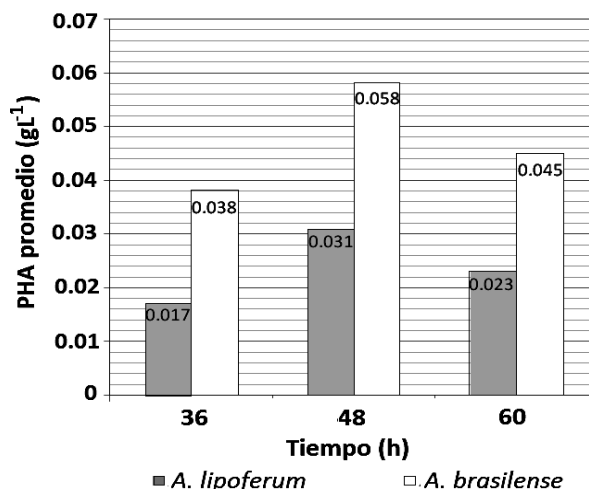
Código cepa UNPRG	PHA ( $\text{gL}^{-1}$ )		
	36 h	48 h	60 h
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-15	0.002	0.013	0.009
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-59a	0.026	0.030	0.018
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-80a	0.041	0.056	0.048
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-80b	0.007	0.056	0.030
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-81a	0.006	0.030	0.025
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-81b	0.052	0.072	0.057
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-86a	0.013	0.017	0.015
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-91	0.009	0.009	0.007
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-52a	0.003	0.016	0.016
<i>A. lipoferum</i> KM(A)-33	0.007	0.014	0.011
<i>A. brasilense</i> KM(A)-01	0.032	0.038	0.030
<i>A. brasilense</i> KM(A)-47a	0.027	0.083	0.075
<i>A. brasilense</i> KM(A)-54	0.053	0.098	0.088
<i>A. brasilense</i> KM(A)-57a	0.006	0.039	0.020
<i>A. brasilense</i> KM(A)-57b	0.025	0.028	0.025
<i>A. brasilense</i> KM(A)-66	0.028	0.031	0.029
<i>A. brasilense</i> KM(A)-84a	0.032	0.041	0.035
<i>A. brasilense</i> KM(A)-84b	0.079	0.093	0.084
<i>A. brasilense</i> KM(A)-22a	0.049	0.079	0.022
<i>A. brasilense</i> KM(A)-47b	0.054	0.046	0.026

En *A. lipoferum* el valor máximo en la concentración de PHA fue  $0.661 \text{ gL}^{-1}$ , inferior a  $3.5 \text{ gL}^{-1}$  reportado por Etienne *et al.* (1990); sin embargo, este investigador utilizó glucosa como fuente de carbono. En la presente investigación *A. brasilense* superó en su mayoría a las cepas de *A. lipoferum* aisladas de tomate (Figura 2) y de arroz (Figura 3), alcanzando un valor máximo de PHAs de  $0.738 \text{ gL}^{-1}$ , superior a  $0.160$  y  $0.350 \text{ gL}^{-1}$ , reportados por Martínez *et al.* (2004) y Cholula (2005) para *A. brasilense* cultivado en caldo tomate y medio *Azotobacter*, respectivamente.

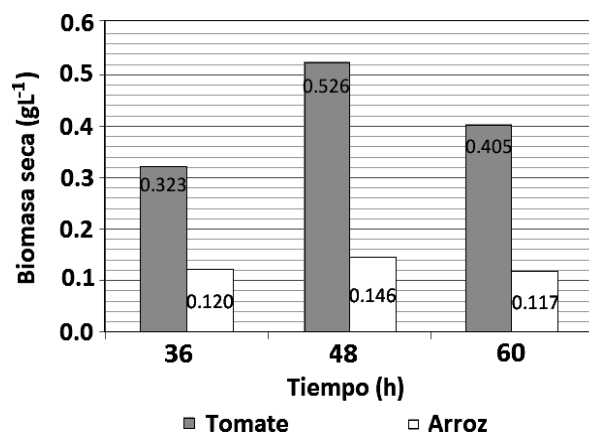
Existen cerca de 300 especies de bacterias que pueden sintetizar PHAs; sin embargo, sólo algunas son consideradas para la producción a gran escala y una de ellas es *A. brasilense* (Franco *et al.*, 2009). La cepa nativa *A. brasilense* KM(T)-19 es promisoría, debido a que cuando se mejoran las condiciones de fermentación es posible alcanzar valores superiores en la concentración de PHAs, como lo demostraron Martínez *et al.* (2004), quienes obtuvieron  $1,2 \text{ gL}^{-1}$  al cultivar la bacteria en biorreactor con agitación- aireación de  $500 \text{ rpm} - 0.17 \text{ L minuto}^{-1}$ .



**Figura 2.** PHA de 20 cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* aisladas de tomate.



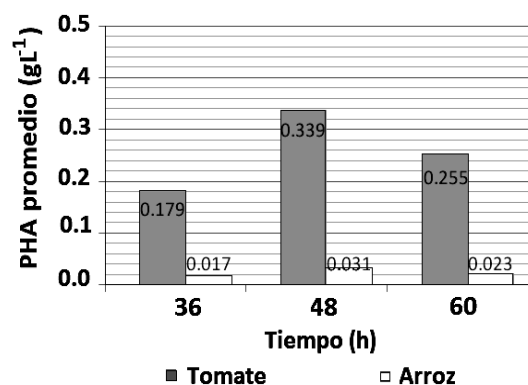
**Figura 3.** PHA de 20 cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* aisladas arroz.



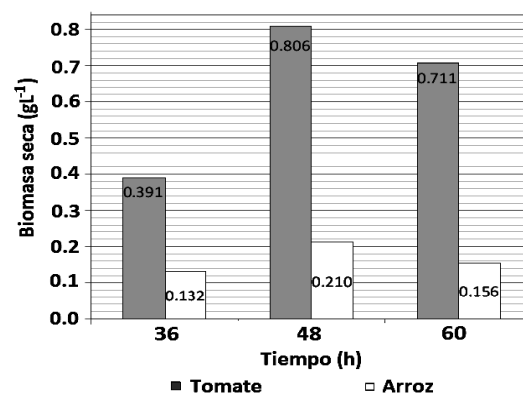
**Figura 4.** Biomasa de cepas de *Azospirillum lipoferum* aisladas de tomate y arroz.

Las cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de tomate fueron superiores en biomasa y PHAs respecto a las de arroz (Figuras 4, 5, 6 y 7). Al estudiar la cinética de la biomasa (Tablas 3 y 4) se debe tener en cuenta que estas bacterias sintetizan PHAs en la fase estacionaria (Etienne *et al.*, 1990, Martínez *et al.*, 2004) por lo tanto se trata de biomasa más polímero y en las bacterias aisladas de tomate se observa una diferencia mínima entre las 24 y 36 horas, disminuyendo en el 60% e incrementando en el 40% de las cepas.

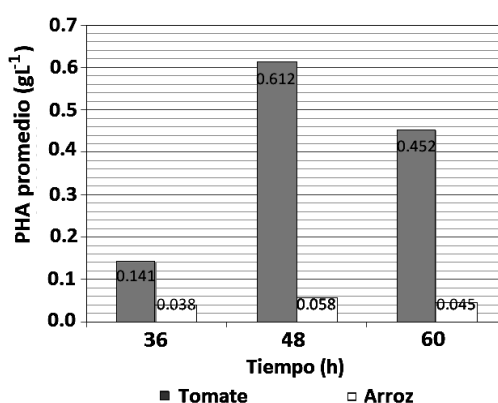




**Figura 5.** PHA de cepas de *Azospirillum lipoferum* aisladas de tomate y arroz.



**Figura 6.** Biomasa de cepas de *Azospirillum brasilense* aisladas de tomate y arroz.



**Figura 7.** PHA promedio (gL<sup>-1</sup>) de cepas de *Azospirillum brasilense* aisladas de tomate y arroz.

**Tabla 3**

Peso de la biomasa seca (gL<sup>-1</sup>) de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de tomate.

Nº	Código cepa UNPRG	Biomasa (gL <sup>-1</sup> )				
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
1	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-10	0.245	0.355	0.338	0.808	0.487
2	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-12a	0.179	0.227	0.218	0.616	0.256
3	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-21	0.195	0.283	0.261	0.381	0.349
4	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-22b	0.238	0.414	0.418	0.671	0.573
5	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-23	0.226	0.344	0.301	0.538	0.400
6	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-28	0.192	0.296	0.287	0.341	0.423
7	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-39	0.227	0.291	0.253	0.295	0.287
8	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-43b	0.224	0.287	0.249	0.291	0.250
9	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-50	0.219	0.301	0.277	0.328	0.375
10	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-52	0.192	0.279	0.280	0.559	0.343
11	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-54	0.227	0.299	0.282	0.312	0.322
12	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-64	0.287	0.522	0.461	0.538	0.399
13	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-68	0.187	0.303	0.275	0.706	0.344
14	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-79	0.242	0.418	0.424	0.680	0.597
15	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-88	0.255	0.395	0.426	0.416	0.344
16	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-73	0.275	0.400	0.405	0.722	0.725
17	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-94a	0.185	0.233	0.223	0.60	0.248
18	<i>A. lipoferum</i> KM(T)-96a	0.238	0.414	0.418	0.671	0.573
19	<i>A. brasilense</i> KM(T)-19	0.256	0.389	0.397	0.837	0.815
20	<i>A. brasilense</i> KM(T)-24	0.205	0.376	0.386	0.775	0.607

**Tabla 4**

Peso de la biomasa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ) de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de arroz.

Nº	Código cepa UNPRG	Biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ )				
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
1	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-15	0.046	0.120	0.110	0.162	0.108
2	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-59a	0.078	0.117	0.134	0.156	0.112
3	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-80a	0.082	0.140	0.165	0.182	0.175
4	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-80b	0.077	0.104	0.109	0.078	0.049
5	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-81a	0.081	0.123	0.145	0.163	0.165
6	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-81b	0.080	0.118	0.145	0.234	0.167
7	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-86a	0.074	0.114	0.129	0.150	0.166
8	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-91	0.030	0.034	0.042	0.070	0.048
9	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-52a	0.039	0.086	0.112	0.142	0.114
10	<i>A. lipoferum</i> KM(A)-33	0.043	0.090	0.114	0.123	0.095
11	<i>A. brasilense</i> KM(A)-01	0.034	0.098	0.327	0.410	0.326
12	<i>A. brasilense</i> KM(A)-47a	0.032	0.035	0.038	0.226	0.130
13	<i>A. brasilense</i> KM(A)-54	0.072	0.142	0.180	0.252	0.281
14	<i>A. brasilense</i> KM(A)-57a	0.035	0.036	0.047	0.234	0.129
15	<i>A. brasilense</i> KM(A)-57b	0.079	0.113	0.108	0.133	0.143
16	<i>A. brasilense</i> KM(A)-66	0.035	0.084	0.101	0.167	0.116
17	<i>A. brasilense</i> KM(A)-84a	0.062	0.104	0.105	0.147	0.193
18	<i>A. brasilense</i> KM(A)-84b	0.064	0.116	0.098	0.142	0.173
19	<i>A. brasilense</i> KM(A)-22a	0.083	0.140	0.146	0.204	0.121
20	<i>A. brasilense</i> KM(A)-47b	0.080	0.146	0.166	0.186	0.127

Por el contrario, en las bacterias aisladas de arroz, la biomasa más polímero se incrementó en 85% y disminuyó en 15% de las cepas. La diferencia se atribuye a que las cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de tomate desarrollaron mayor biomasa y por lo tanto alcanzaron la fase estacionaria con el agotamiento de nutrientes antes de las 24 horas cuando se realizó la alimentación con carbono, coincidiendo con Madigan *et al.* (2004), quienes manifestaron que en un sistema batch como el utilizado en las primeras 24 horas, donde no se renueva el medio de cultivo, el crecimiento microbiano no se observa indefinidamente debido a que los nutrientes se agotan o los productos de desecho se acumulan hasta alcanzar concentraciones inhibitorias. Por lo expuesto, y para incrementar la síntesis de PHAs, se inició la alimentación con ácido málico debido a que *Azospirillum* spp. produce PHAs cuando existe limitación de nutrientes y un exceso de fuente carbono (Martínez *et al.*, 2004). Bajo estas condiciones la

concentración de la coenzima NADH se incrementa y el exceso de esta fuente reductora es eliminada mediante la síntesis de PHAs (Cholula, 2005).

En la mayoría de las cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de tomate y arroz la síntesis de PHA disminuyó a las 60 horas, coincidiendo con lo manifestado por Cholula (2005), quien determinó que la composición celular de *A. brasilense* respecto al PHB sufre cambios en un cultivo en lote alimentado y una vez que alcanza un punto máximo de 17% en el rendimiento después de 36 horas, este porcentaje no se mantiene sino que el biopolímero es rápidamente metabolizado por las células, alcanzando solo 10% después de 48 horas. De igual manera, Franco *et al.* (2009) informaron que *Streptomyces subutilus* alcanzó el mayor porcentaje (23.33%) de PHAs a las 24 horas, disminuyendo hasta 10.5% después de 192 horas, lo que significaría que los PHAs se están consumiendo para abastecer las necesidades energéticas.

Debido a que la síntesis y utilización de los PHAs es considerada como una estrategia desarrollada por las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes estresantes (De Almeida *et al.*, 2004), es posible que las cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de tomate alcanzaron una mayor concentración de PHAs como consecuencia de un proceso de adaptación a condiciones edafoclimáticas no adecuadas. Bashan *et al.* (1996) consideraron como factores de estrés para *Azospirillum* spp. en el suelo la falta de humedad, elevado porcentaje de arena, carbonato de calcio y aireación, valores bajos de pH así como temperaturas bajas. En cuanto al pH, las especies de *A. lipoferum* y *A. brasilense* se encuentran en abundancia en suelos con valores cercanos a la neutralidad, en un rango comprendido entre 6.8 y 7.8 y respecto a la temperatura el crecimiento de *Azospirillum* spp. ocurre entre 32 y 36 °C (Cholula, 2005). Según Loredó *et al.* (2004), la oxigenación desvía el metabolismo hacia cuotas mayores de respiración, mayor oxidación de los sustratos disponibles y por tanto menor disponibilidad de acetil-CoA para la producción de PHAs. El cultivo de arroz se realiza en suelos con un primer horizonte de 18 cm con textura franco arenoso y un segundo horizonte con alta concentración de arcilla, profundidad entre 18 y 54 cm, con elevada estabilidad en sus agregados, un drenaje lento y retención de humedad. Químicamente los suelos son neutros o ligeramente alcalinos con significativas concentraciones de carbonato de calcio, potasio, magnesio y elementos menores (Vallejo *et al.*, 2008). En cuanto a la temperatura se considera que valores menores de 21 °C son limitantes para el cultivo. Por su parte, el tomate se cultiva en varios tipos de suelo pero de preferencia franco arenoso, con buen drenaje considerándose un pH comprendido entre 5.5 a 6.0 como óptimo para el cultivo. En campo definitivo requiere temperaturas comprendidas entre 15 y 21 °C en el día y 14 a 17 °C en la noche (Cárdenas, 2006). Según lo expuesto, las condiciones de

los dos cultivos difieren entre sí y es posible que el tomate presente condiciones más estresantes que favorecen la síntesis de PHAs en *Azospirillum* spp. lo que explicaría la superioridad en la concentración de PHA de las cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense* aisladas de tomate frente a las de arroz.

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que es posible obtener cepas de *Azospirillum* spp. productoras de PHAs con un 35.42% de positividad en muestras de raíces de tomate y 58.33% en arroz. En ambos cultivos se identificó *A. lipoferum* y *A. brasilense* y en todas las cepas bacterianas se detectaron gránulos de PHAs. La concentración de PHA alcanzó un valor máximo de 0.661 gL<sup>-1</sup> en *Azospirillum lipoferum* KM(T)-73 y 0.738 gL<sup>-1</sup> en *Azospirillum brasilense* KM(T)-19, observándose que en conjunto las cepas aisladas de tomate alcanzaron una mayor concentración de biomasa y PHAs frente a las cepas aisladas de arroz.

#### Referencias

- Abril, A.; Biasutti, C.; Maich, R.; Dubbini, L.; Noe, L. 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida-central de Argentina: Factores que afectan la colonización rizosférica. Tesis de grado, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Alfonso, E.; Leyva, A.; Hernández, A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista Colombiana Biotecnológica 7: 47-54.
- Bashan, Y.; Holguin, G.; Ferrera, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Azospirillum*. Revista Terra 14: 159-180.
- Caballero, J. 2001. El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, México.
- Cárdenas, C. 2006. Evaluación de la roca fosfórica Carolina del Norte inoculada con cepas fúngicas como fertilizantes para la producción de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. Tesis de grado, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Carreño, C.; Mendoza, G.; Mendoza, G.; Villanueva, C. 2009. Manual de Prácticas Microbiología en el

- Tratamiento de Desechos. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Cholula, L. 2005. Estudio de la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de grado, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Collados, C. 2006. Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. Tesis de grado, Universidad de Granada, Granada.
- De Almeida, A.; Ruiz, N.; López, N.; Pettineri, J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. Revista Química Viva 3: 122-133.
- Etienne, P.; Mulard, D.; Blanc, P.; Fages, J.; Goma, G.; Pareilleux, A. 1990. Effects of partial O<sub>2</sub> pressure, partial CO<sub>2</sub> pressure, and agitation on growth kinetics of *Azospirillum lipoferum* under fermentor conditions. Applied and Environmental Microbiology 56: 3235-3239.
- Franco, Y.; Gómez, G.; Núñez, R.; Martínez, J. 2009. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxibutirato por *Rhizobium tropici*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 40:53-57.
- García, F.; Muñoz, H. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (*Oryzae sativa* L.). Tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Grados, R.; Aliaga, M.; Giménez, A.; Mattiasson, B. 2008. Degradación anaeróbica de desechos agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxialcanoatos. Revista Bipofarba 16: 1-10.
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 2003. Metodología de la Investigación. 3 ed. Mc Graw. Hill International Editores S.A. México.
- Hernández, W. 2003. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en plantas de *Oryzae sativa* (arroz). Tesis de grado, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J.; Williams, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Williams & Wilkins, USA.
- Lara, C.; Villalba, M.; Oviedo, L. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Revista Colombiana Biotecnológica 9: 6-14.
- Lasala, F.; Martínez, A.; Núñez, R.; Rozsa, C.; Galego, N.; Carballo, E.; Solano, R. 2004. Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) por bacterias diazótrofes. Estudio de la síntesis a escala de zaranda con *Mesorhizobium plurifarium* (4033). Revista Biológica 18: 136-146.
- Loredo, C.; López, L.; Espinoza, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. Revista Terra Latinoamericana 8:225-239.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10 ed. Parson Educación, S.A. Madrid, España.
- Martínez, J.; Rodríguez, M.; Fernández, A.; Villaverde, M.; López, A.; Marín, D. 2004. Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazótrofes. Influencia de la aeración de poli-B-hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense* cepa 7. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.
- Matías, M. 2009. Obtención de bioplásticos a partir de fécula de papa (de tercera categoría). Tesis Ingeniería Química. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/17428147/PLAN-DE-TESIS>
- Razzaq, A.; Jamil, N.; Naheed, N.; Hasnain, S. 2010. Bacteria from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. African Journal of Biotechnology 9: 1919-1925.
- Schoebitz, M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Tesis de grado, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. Microbiology Revista 98:158-189.
- Vallejo, M.; Bonilla, C.; Castilla, L. 2008. Evaluación de la asociación bacterias fijadoras de nitrógeno, en *Typic haplustalf* Ibagué, Colombia. Revista Acta Agronómica 57: 1-10.
- Wasim, M. 2006. Role of chemotaxis genes in wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. Tesis de grado, Georgia State University.
- Westby, C.; Cutshall, D.; Vigil, G. 1983. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology 156: 1369-1372.